

Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки

Д.С. Кутилин, И.С. Никитин, О.И. Кит

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России; Россия,
344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. Во всем мире рак тела матки ежегодно диагностируют более чем у 300 тыс. женщин. В настоящее время остается актуальной проблема поиска высокоспецифичных молекулярных онкомаркеров для данного заболевания. Скрининг экспрессии генов транскрипционных факторов, ответственных за контроль дифференцировки клеток тканей эндометрия, может позволить сформировать панель онкомаркеров и исследовать фундаментальные механизмы онкотрансформации.

Цель исследования — анализ изменений в экспрессии транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и C-MYC в тканях тела матки в процессе их малигнизации.

Материалы и методы. Для исследования использовали биоптаты тканей матки (опухолевые и условно-нормальные) 45 пациенток. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени проводили определение относительной экспрессии 3 генетических локусов, кодирующих транскрипционные факторы OCT4, SOX2 и C-MYC, в качестве референсного гена использовали ACTB.

Результаты. Обнаружено изменение транскрипционной активности генов OCT4, SOX2 и C-MYC в опухолевых клетках тела матки при прогрессии опухоли. При снижении степени дифференцировки опухолевых клеток наиболее значительно свою экспрессию увеличивает ген OCT4, что подтверждает его статус маркера недифференцированных клеток. По мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток изменение экспрессии генов OCT4, SOX2 и C-MYC затрагивает и прилежащую условно нормальную ткань тела матки, но с меньшей интенсивностью, особенно на поздних этапах малигнизации.

Заключение. Полученные данные делают возможным использование генов OCT4, SOX2 и C-MYC в качестве дифференциальных маркеров трансформации клеток, а изменение экспрессии гена SOX2 — и в качестве предиктивного маркера малигнизации.

Ключевые слова: экспрессия генов, транскрипционный фактор, плюрипотентность, рак тела матки

Для цитирования: Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):57–62.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62

Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri

D.S. Kutilin, I.S. Nikitin, O.I. Kit

Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia

Background. Worldwide, more than 300,000 women are diagnosed with uterine cancer each year. Currently, the problem of finding highly specific molecular tumor markers for this disease remains relevant. Screening for gene expression of transcription factors responsible for controlling the differentiation of cells of endometrial tissues may allow the formation of a tumor markers panel and explore the fundamental mechanisms of oncotransformation.

Objective of our study was to analyze changes in the expression of transcription factors OCT4, SOX2 and C-MYC in the tissues of the uterus (corpus uteri) during the process of their malignancy.

Materials and methods. Uterus tissue biopsy specimens of 45 patients (tumor and non-tumor) were used for the study. To determine the relative expression of 3 genetic loci encoding the transcription factors OCT4, SOX2 and C-MYC the real-time polymerase chain reaction method, ACTB was used as the reference gene.

Results. A change of OCT4, SOX2 and C-MYC genes transcriptional activity in uterus tumor cells is found as the tumor develops. By reducing the tumor cells differentiation degree expression of OCT4 gene increases most significantly, that confirms its status of undifferentiated cellsmarker. As the differentiation degree of tumor cells decreases, OCT4, SOX2 and C-MYC genes expression change affects the adjacent conditionally normal tissue of the uterus, but with less intensity, especially in the later stages of malignancy.

Conclusion. The obtained data makes it possible to use the OCT4, SOX2 and C-MYC genes as differential markers of the tumor process development, and the SOX2 gene expression as a predictive marker of malignancy.

Key words: gene expression, transcription factor, pluripotency, corpus uteri cancer

For citation: Kutilin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62.

Введение

Рак тела матки — наиболее распространенная инвазивная злокачественная опухоль матки у женщин, во всем мире ежегодно ее диагностируют более чем у 300 тыс. женщин [1]. Поиск высокоспецифичных молекулярных онкомаркеров для данного заболевания остается приоритетной задачей, что подтверждается результатами ряда исследований, посвященных этому направлению [2, 3]. Опухолевые клетки характеризуются нарушением функционирования сигнальных путей, обеспечивающих повышение пролиферативной активности и immortalization клеток [4]. Транскрипционные факторы, кодируемые генами *OCT4* и *SOX2*, участвуют в регуляции работы человеческих эмбриональных стволовых клеток и поэтому могут играть важную роль в прогрессии опухолей. Ген *OCT4* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток, и широко используется как маркер для недифференцированных клеток [5]. *SOX2* кодирует фактор транскрипции, который имеет большое значение для поддержания самообновления недифференцированных эмбриональных стволовых клеток, а его гиперэкспрессия активизирует миграцию опухолевых клеток. В эмбриональных стволовых клетках *SOX2* контролирует экспрессию *OCT4* [6]. Транскрипционный фактор, кодируемый геном *C-MYC*, регулирует экспрессию до 15 % всех генов, включая гены, контролирующие репликацию ДНК [7]. Мутантные версии гена *Мус* обнаружены во многих опухолях, при этом ген экспрессируется постоянно, что приводит к нарушению регуляции активности многих генов, в том числе отвечающих за пролиферацию и дифференцировку клеток, а также самообновление стволовых клеток [8].

Скрининг экспрессии генов транскрипционных факторов, ответственных за контроль над пролиферацией и дифференцировкой клеток тканей эндометрия, позволит осуществить создание панели специфичных онкомаркеров и исследовать фундаментальные механизмы онкотрансформации.

Цель исследования — анализ изменений в экспрессии транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в тканях тела матки в процессе их малигнизации.

Материалы и методы

Для исследования использовали биоптаты тканей матки (опухолевые и условно-нормальные) 45 пациентов в возрасте 37–75 лет с гистологически подтвержденным диагнозом рака тела матки.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидинтиоцианата, 25 мМ цитрата натрия,

0,5 % саркозила и 0,1 М 2-меркаптоэтанола. Дальнейшее выделение РНК из тканей выполняли методом гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции и обрабатывали ДНКазой 1 для удаления геномной ДНК [9]. Перед реакцией обратной транскрипции для проверки качества выделенной РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле в ТВЕ-буфере [10] (рис. 1).

Синтез комплементарной ДНК выполняли с использованием коммерческих наборов РЕВЕРТА-Л (Интерлабсервис, Россия) [11].

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили определение относительной экспрессии 3 генетических локусов, кодирующих транскрипционные факторы *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC*. Дизайн праймеров для *OCT4* и *SOX2* осуществляли с применением референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST. В качестве референсного гена использовали ген *ACTB*, последовательности прямого и обратного праймеров к которому были подобраны нами ранее [9] (см. таблицу).

Принцип использованного метода заключается в анализе сигналов амплификации генов-мишеней и референсного гена в исследуемых пробах. Анализируемые последовательности генетических локусов амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ dNTPs, 2,5 мМ $MgCl_2$, 1х ПЦР-буфер и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы *Thermusaquaticus*, краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров. Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (BioRad, США). Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ [12].

Статистический анализ выполняли с помощью прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013

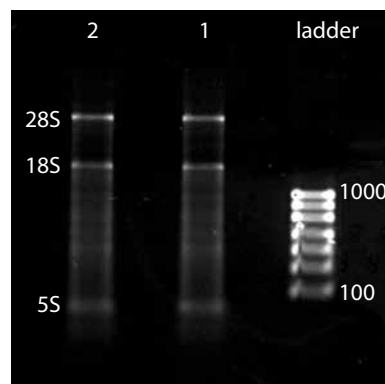


Рис. 1. Электрофорез РНК в 2 % агарозном геле (соотношение 1:1 интенсивности полос 18S и 28S свидетельствует о пригодном для анализа экспрессии генов качестве РНК)

Fig. 1. RNA electrophoresis in 2 % agarose gel (1:1 intensity ratio shows usability RNA for gene expression analysis)

Характеристика праймеров

Primer characteristics

Наименование праймеров Primer name	№ NCBI GenBank NCBI GenBank No.	Последовательность Sequence
OCT_4_F	NM_002701.5	AAT TTG TTC CTG CAG TGC CC
OCT_4_R		TAC AGA ACC ACA CTC GGA CC
C-MYC_F	NM_002467.4	CAC CAC CAG CAG CGA CT
C-MYC_R		GAC TCT GAC CTT TTG CCA GGA
SOX2_F	NM_003106.3	CCC CTG TGG TTA CCT CTT CC
SOX2_R		CTG ATC ATG TCC CGG AGG TC
ACTB_F	NM_001101.3	AAC CGC GAG AAG ATG ACC C [9]
ACTB_R		AGC ACA GCC TGG ATA GCA AC [9]

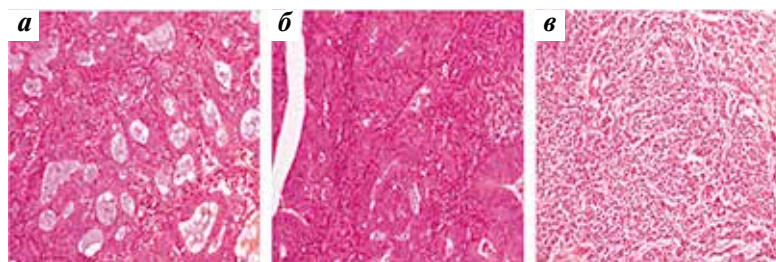
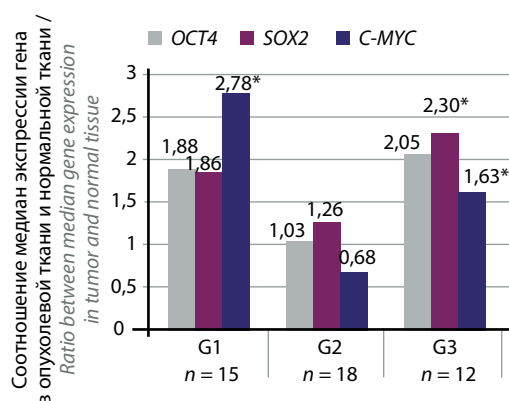


Рис. 2. Сравнение соотношения экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в опухолевой ткани к условно-нормальной ткани матки у пациенток с аденокарциномой матки стадий дедифференцировки G1, G2 и G3. Представлены фотографии гистологических препаратов, соответствующих стадиям G1 (а), G2 (б) и G3 (в) ($\times 200$). *Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между экспрессией соответствующего гена в опухоли и в нормальной ткани

Fig. 2. Comparison of *OCT4*, *SOX2* and *C-MYC* gene expression ratios in tumor tissue and relatively normal uterine tissue in patients with G1, G2 and G3 dedifferentiation stages of uterine adenocarcinoma. Photos of histological samples are presented corresponding to G1 (a), G2 (б) and G3 (в) stages ($\times 200$). *Significant differences ($p < 0.05$) between gene expression in tumor and normal tissue

и Statistica 8.0. Оценку различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и корреляционного анализа (коэффициент корреляции Пирсона, r) для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

С учетом роли в клеточной дифференцировке выбранных для исследования генов было проведено ранжирование имеющейся выборки пациенток по стадиям дедифференцировки клеток опухолей G1, G2 и G3.

У группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G1 в возрасте 45–68 лет обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии гена *SOX2* на 178 %, у пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G2 в возрасте 37–69 лет не выявлено статистически значимого изменения экспрессии исследуемых генетических локусов, а у пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G3 в возрасте

55–75 лет обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *SOX2* и *C-MYC* на 63 и 130 % соответственно в опухолевой ткани матки по отношению к условно-нормальной (рис. 2).

Следует отметить, что экспрессия пар генов *OCT4* и *SOX2*, *OCT4* и *C-MYC*, *C-MYC* и *SOX2* и в условно нормальной, и в опухолевой тканях разной степени дифференцировки обладает сильной положительной корреляцией, варьирующей от +0,940 до +0,998.

Также обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в 35, 7 и 2 раза соответственно в опухолевой ткани на стадии дедифференцировки G3 по отношению к экспрессии этих генов в опухолевой ткани на стадии дедифференцировки G1 и увеличение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в 32, 12 и 2 раза соответственно в нормальной ткани на стадии дедифференцировки G3 по отношению к экспрессии этих генов в нормальной ткани на стадии дедифференцировки G1 (рис. 3).

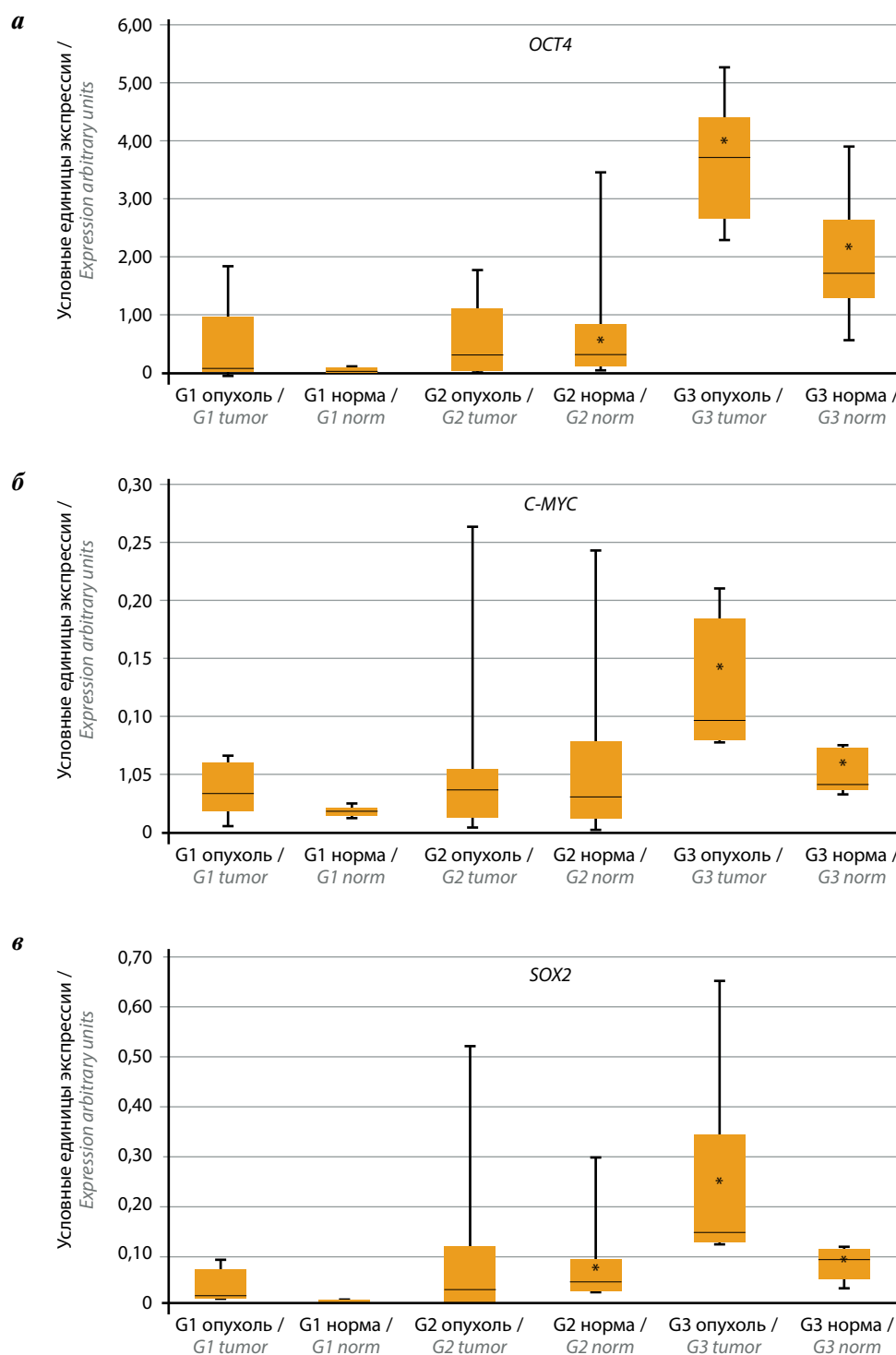


Рис. 3. Сравнение относительной экспрессии в опухолевой и условно-нормальной ткани матки у пациенток с аденокарциномой матки стадий дедифференцировки G1, G2 и G3: а – гена OCT4; б – гена C-MYC; в – гена SOX2. *Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по отношению к степени дедифференцировки G1

Fig. 3. Comparison of relative expression in tumor tissue and relatively normal uterine tissue in patients with G1, G2 and G3 dedifferentiation stages of uterine adenocarcinoma: а – OCT4 gene; б – C-MYC gene; в – SOX2 gene. *Significant differences ($p < 0.05$) relative to dedifferentiation grade G1

Обсуждение

В последние годы результаты многих исследований показали, что нарушение экспрессии некоторых связанных со стволовыми клетками транскрипционных факторов, таких как OCT4, Sex-Z, Nanog и Klf4, может

способствовать развитию опухолевого процесса в различных тканях [2, 13].

Sex-determining region Y (SRY)–Box2 (SOX2) является членом семейства транскрипционных факторов SOX, отвечающих за координацию такой функции,

как ограничение дифференцировки. Уровень экспрессии *SOX2* строго регулируется для обеспечения нормального развития эмбриона. Снижение экспрессии *SOX2* способствует дифференцировке эмбриональных стволовых клеток в различные типы клеток.

SOX2 — ключевой фактор, способный индуцировать плюрипотентность в соматических клетках наряду с *Klf4*, *OCT3/4* и *C-MYC*. Это также 1 из 4 транскрипционных факторов, способных перепрограммировать соматические клетки человека в плюрипотентные стволовые клетки с характеристиками эмбриональных стволовых клеток [14].

OCT4 является ядерным транскрипционным фактором семейства POU, который играет критическую роль в самообновлении и плюрипотентности. На начальных этапах эмбрионального развития в плюрипотентных клетках *OCT4* и *SOX2* функционируют совместно, стимулируя транскрипцию нескольких генов-мишеней, включая *NANOG*, *FGF-4*, *UTFI*, *FBX15*, *microRNA-302* и даже самих *SOX2* и *OCT4*.

Сверхэкспрессия транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* также может обеспечивать приобретение клетками плюрипотентности. Однако до настоящего времени не было опубликовано исследований о потенциальной функции *SOX2* при раке эндометрия [15]. К. Pityński и соавт. использовали иммуногистохимический метод для оценки уровней биосинтеза *SOX2* и *OCT4* в качестве маркеров стволовых клеток в 69 образцах опухолевых тканей тела матки на ранней стадии [2]. Также была оценена коэкспрессия *SOX2* и *OCT4* и их корреляция с клинико-патологическими признаками. Наивысшая экспрессия *SOX2* была обнаружена в образцах со стадией дедифференцировки G3 по сравнению с образцами G2 и G1, при этом различий в экспрессии *OCT4* по стадиям дедифференцировки не было отмечено. Это частично согласуется с результатами, полученными в нашем исследовании: показано увеличение экспрессии гена *SOX2* от стадии G1 к G2 на 33 % и от стадии G2 к G3 на 80 %, при этом синхронное увеличение экспрессии *SOX2* наблюдалось и в прилежащей условно-нормальной ткани. Однако уровень экспрессии *SOX2* был статистически значимо

выше в опухолевой ткани по сравнению с прилежащей условно-нормальной тканью (для G1 и G2).

Также нами были обнаружены различия в экспрессии *OCT4* по стадиям дедифференцировки опухолевой ткани тела матки, что согласуется с результатами, описанными в работах L. You и соавт. и N. Hatefi и соавт. [16, 17], в которых показано, что экспрессия *OCT4* в опухолевой ткани коррелирует со стадией дедифференцировки, размером опухоли и может служить независимым прогностическим биомаркером.

В работе C.J. Lee и соавт. экспрессия *SOX2* и *MYC*, но не *OCT4* и *NANOG*, коррелирует с плохим прогнозом, при этом экспрессия *SOX2* отрицательно коррелирует с уровнем *MYC* [18]. В нашем же исследовании экспрессия пар генов *OCT4* и *SOX2*, *OCT4* и *C-MYC*, *C-MYC* и *SOX2* в опухолевых тканях разной стадии дедифференцировки характеризовалась сильной положительной корреляцией, что, по-видимому, отражает синхронную активацию данных транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки, которые, в свою очередь, активируют ряд ключевых генов разных сигнальных путей.

Заключение

Таким образом, обнаруженное изменение транскрипционной активности генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* ассоциировано с «озлокачествлением» опухолевых клеток тела матки в процессе прогрессии опухоли, что делает возможным их использование в качестве дифференциальных маркеров трансформации клеток, а изменение экспрессии гена *SOX2* — и в качестве предиктивного маркера малигнизации. Из исследованных транскрипционных факторов по мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток наиболее значительно свою экспрессию увеличивает ген *OCT4*, что подтверждает его статус маркера недифференцированных клеток. По мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток изменение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* затрагивает и прилежащую условно-нормальную ткань тела матки, но с меньшей интенсивностью, особенно на поздних этапах малигнизации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутин Д.С. и др. Аберрантная транскрипционная активность апоптоз-регулирующих генов при малигнизации тканей тела матки. Молекулярная медицина 2018;16(1):25–32. DOI: 10.29296/24999490-2018-01-05. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutin D.S. Aberrant transcriptional activity of apoptosis-regulating genes in malignant neoplasm of corpus uteri. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2018;16(1):25–31 (In Russ.).]
2. Pityński K., Banas T., Pietrus M. et al. SOX-2, but not Oct4, is highly expressed in early-stage endometrial adenocarcinoma and is related to tumour grading. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(7):8189–98.
3. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутин Д.С. и др. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки. Кубанский научный медицинский вестник 2016;157(2):84–90. DOI: 10.25207/1608-6228-2016-2-84-90. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutin D.S. et al. Changes in expression of estrogen-regulatory genes in malignancy uterine tissues. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin 2016;(2):84–90. (In Russ.).]
4. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase

- approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006;59(8):790–800. DOI: 10.1136/jcp.2005.031351. PMID: 16873561.
5. Chen Z., Xu W.R., Qian H. et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009;99(7):414–19. DOI: 10.1002/jso.21270. PMID: 19347886.
 6. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):625–35. DOI: 10.1038/ncb1589. PMID: 17515932.
 7. Gearhart J., Pashos E.E., Prasad M.K. Pluripotency redux – advances in stem-cell research. *N Engl J Med* 2007;357(15):1469–72. DOI: 10.1056/NEJMp078126. PMID: 17928593.
 8. Chen Y., McGee J., Chen X. et al. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PLoS One* 2014;9(5):e98293. DOI: 10.1371/journal.pone.0107646. PMID: 24874471.
 9. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Способ прогнозирования рецидивов рака тела матки на основании уровня экспрессии генов *PTEN* и *CYP1B1*. Патент на изобретение RUS 2605302, 10.11.2015. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S. et al. Method of recurrent endometrial cancer prediction based on *PTEN* and *CYP1B1* genes expression level. Patent for invention RUS 2605302, 10.11.2015. (In Russ.)].
 10. Кутилин Д.С. Молекулярные механизмы реализации геропротекторной активности пептида дельта-сна. Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04. Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону, 2013. [Kutilin D.S. Molecular mechanisms for the implementation of geroprotective activity of the delta-sleep peptide. Author's abstract of thesis ... of candidate biological sciences: 03.01.04. South Federal University. Rostov-on-Don, 2013. (In Russ.)].
 11. Кит О.И., Водолажский Д.И., Димитриади С.Н. и др. Активность проапоптотических генов повышается после ишемии/реперфузии почки. Молекулярная биология 2017;51(3):502–11. DOI: 10.7868/S0026898417030090. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Dimitriadi S.N. et al. The activity of pro-apoptotic genes increases after renal ischemia/reperfusion. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2017;51(3):445–52. (In Russ.)]
 12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
 13. Hubbard S., Gargett C. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction* 2010;140(1):23–32. DOI: 10.1530/REP-09-0411. PMID: 20089663.
 14. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663–76. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024. PMID: 16904174.
 15. Rizzino A. The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells* 2013;31(6):1033–9. DOI: 10.1002/stem.1352. PMID: 23401375.
 16. You L., Guo X., Huang Y. Correlation of cancer stem-cell markers OCT4, SOX2, and NANOG with clinicopathological features and prognosis in operative patients with rectal cancer. *Yonsei Med J* 2017;59(1):35–42. DOI: 10.3349/ymj.2018.59.1.35. PMID: 29214774.
 17. Hatefi N., Nouraei N., Parvin M. et al. Evaluating the expression of OCT4 as a prognostic tumor marker in bladder cancer. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(6):1154–61. PMID: 23653844.
 18. Lee C.J., Sung P.L., Kuo M.H. et al. Crosstalk between SOX2 and cytokine signaling in endometrial carcinoma. *Sci Rep* 2018;8(1):17550. DOI: 10.1038/s41598-018-35592-0. PMID: 30510261.

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, разработка праймеров, проведение молекулярно-генетического исследования, анализ данных;

И.С. Никитин: сбор биологического материала, его описание, гистологическая верификация, подготовка к молекулярно-генетическому исследованию, анализ данных;

О.И. Кит: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

D.S. Kutilin: developing the research design, article writing, primer development, molecular and genetic analysis, data analysis;

I.S. Nikitin: acquirement of biological material and its description, histological verification, preparation for molecular and genetic analysis, data analysis;

O.I. Kit: developing the research design, article editing, reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.С. Кутилин/D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

О.И. Кит/O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 31.01.2019. **Принята к публикации:** 19.03.2019.

Article received: 31.01.2019. **Accepted for publication:** 19.03.2019.